www.abpsoil.com
ابنیه پایدار سبز

جمهوری اسلامی ایران

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شمارهٔ استاندارد ایران

5870

آب ـ شناسایی و شمارش باکتریهای احیاء کننده سولفات به روش MPN ـ روش آزمون میکروبیولوژی

چاپ اول

آشنایی با مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب قانون، تنها مرجع رسمی کشور است که عهده دار وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) میباشد.

تدوین استاندارد در رشته های مختلف توسط کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه، صاحبنظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی واقتصادی آگاه ومرتبط با موضوع صورت میگیرد. سعی بر این است که استانداردهای ملی، در جهت مطلوبیت ها و مصالح ملی وبا توجه به شرایط تولیدی،

فنی و فن آوری حاصل از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع شامل: تولیدکنندگان ،مصرف کنندگان، بازرگانان، مراکز علمی و تخصصی و نهادها و سازمانهای دولتی باشد.پیش نویس استانداردهای ملی جهت نظرخواهی برای مراجع ذینفع واعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال میشود و پس از دریافت نظرات وپیشنهادها در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح ودر صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که توسط مؤسسات و سازمانهای علاقمند و ذیصلاح و با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می شود نیز پس از طرح و بررسی در کمیته ملی مربوط و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی چاپ ومنتشرمی گردد. بدین ترتیب استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد مندرج در استاندارد ملی شماره ((۵)) تدوین و در کمیته ملی مربوط که توسط مؤسسه تشکیل میگردد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد میباشد که در تدوین استانداردهای ملی ضمن توجه به شرایط کلی ونیازمندیهای خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین المللی استفاده می نماید.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون به منظور حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی وعمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردها را با تصویب شورای عالی استاندارد اجباری نماید. مؤسسه می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه بندی آنرا اجباری نماید.

همچنین بمنظور اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمانها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و گواهی کنندکان سیستم های مدیریت کیفیت ومدیریت زیست محیطی، آزمایشگاهها و کالیبره کنندگان وسایل سنجش، مؤسسه استاندارد اینگونه سازمانها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران مورد ارزیابی قرار داده و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آنها اعطا نموده و بر عملکرد آنها نظارت

می نماید. ترویج سیستم بین المللی یکاها ، کالیبراسیون وسایل سنجش تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی از دیگر وظایف این مؤسسه می باشد.

کمیسیون استاندارد آب ـ شناسایی و شمارش باکتری های احیا کننده سولفات به روش MPN – روش آزمون

رئیس	سمت نمایندگی
فیروزی ،فیروزه(فوق لیسانس میکروبیولوژی)	دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
اعضاء	
جهانتاب ، سهیلا(فوق لیسانس میکروبیولوژی)	شرکت آب و فاضلاب استان تهران
خنافری، آنیتا(دکترای میکروبیولوژی)	دانشگاه آزاد اسلامی
قاهری، محمود(فوق لیسانس شیمی)	سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران
هاتفی ، میترا(فوق لیسانس میکروبیولوژی)	شرکت داروگر – کف
دبیران	
رشید نجفی، فریده(لیسانس بیولوژی)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
قبادی دانا، مریم(لیسانس میکروبیولوژی)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مقدمه

تشکیل بیوفیلم های میکروبی و به دنبال آن خوردگی در تجهیزات و شبکه ها از جمله مسایل مهم در صنایع گوناگون به ویژه صنایع نفت، پتروشیمی و همچنین انشعابات آب و فاضلاب می باشد . موجودات مختلف مانند باکتریها، قارچها ، جلبک ها و جانوران دریایی به طور مستقیم و یا غیر مستقیم در فرآیند خوردگی شرکت می کنند . رشد این میکروارگانیسم ها با ترشح پلیمر خارج سلولی[1] همراه می باشد که سبب تشکیل لایه ای به نام بیوفیلم بر سطوح تجهیزات می شود. این لایه در نتیجهٔ جذب مواد معلق موجود در آب حجیم می شود. با تشکیل بیوفیلم بر جداره سطوح، شرایط جهت رشد باکتریهای خورنده که

1) Ep_s = Exopolymers

مهمترین آنها باکتریهای احیا کننده سولفات می باشند، مساعد گردیده و در زیر رسوبات تشکیل شده ، خوردگی میکروبی ظاهر می شود.[2]

باکتریهای احیا کنندهٔ سولفات، بطور وسیعی از اقیانوسها ،آبهای شیرین ،رسوبات و لجن ها پراکنده می باشند و در حین تکثیر با استفاده از سولفات به عنوان پذیرنده نهایی الکترون ،سولفید هیدروژن تولید می نمایند. تاکنون حدود ١٤ جنس از این گروه باکتریها شناخته شده که به جز جنس دسولفونما[3] تمامی آنها گرم منفی می باشند.[4] مطالعات نشان می دهد که یک جنس از این باکتریها به نام دِسولفوویبریو[5] ، می تواند در حین تکثیر فعال خود، بیش از ١٠ گرم در لیتر سولفید تولید نماید. اگر مقدار سولفید هیدروژن به ppm ٠/٥ برسد بوی آن در آب آشامیدنی قابل تشخیص می باشد و اگر این غلظت حدود ppm ١ باشد ، آب را سیاه و متعفن می کند و اگر به بیش از ١ ppm برسد علاوه بر استشمام بوی تعفن، آب را بسیار خورنده می سازد. به علاوه مواردی از ایجاد کولیت زخمی شونده توسط باکتریهای احیا کننده سولفات گزارش گردیده است، این باکتریها در شرایط مناسب با رشد خود در داخل خطوط لوله ها، ایجاد توده های بسیار بزرگی به نام گالوانیک سل می کنند. تاثیر سوء این توده ها در خورندگی خطوط لوله ها بیش از اثر سولفید هیدروژن بر فلزات یابتون می باشد.

با توجه به مطالب فوق، شناسایی و شمارش این باکتریها در آب آشامیدنی ضروری می باشد.

پیشگفتار

استاندارد آب ـ روش آزمون شناسایی و شمارش باکتریهای احیا کننده سولفات به روش MPN که توسط کمیسیون های فنی مربوطه تهیه و تدوین شده و در چهل و یکمین جلسه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی مورخ ٨٢/٥/٢٥ مورد تصویب قرار گرفته است ، اینب د بند ١ ماده ٣ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ١٣٧١ به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می شود .

برای حفظ همگامی و هماهنگی بار پیشرفتهای ملی و جهانی در زمینه صنایع و علوم و خدمات استانداردهای ملی ایران در موقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر گونه پیشنهادی که برای اصلاح یا

---

2) SRB = Sulphate Reducing Bacteria
3) Microbiologically Influenced Corrosion
4) Desulfonemo
5) Desulfo vibrio

تکمیل این استاندارد برسد در تجدید نظر بعدی مورد توجه قرار خواهد شد. بنابراین برای مراجعه به استاندارد ایران باید همواره از آخرین چاپ و تجدید نظر آنها استفاده کرد.

در تهیه و تدوین این استاندارد سعی شده است که ضمن توجه به شرایط موجود و نیازهای جامعه در حد امکان بین این استاندارد و استاندارد ملی کشورهای صنعتی و پیشرفته هماهنگی ایجاد شود. لذا با بررسی امکانات و مهارتهای موجود و اجرای آزمایشهای لازم این استاندارد با استفاده از منابع زیر تهیه گردیده است.

1- ASTM - D4412 1984 –Standard Test Methods for Sulfate-Reducing Bacteria in Water and Water- Formed Deposits
2- Collette Ifill- " The Isolation and Purification of Sulphate- reducing Bacteria from the colon of patients suffering from Ulcerative Colitis" University of Portsmouth. School of Pharmacy and Biomedical Science Bsc(Hons) Biomedical Science June 1999.
3- James Mellor. "Characterisation of thiosulfate reducing bacteria- 2000.

آب ـ شناسائی و شمارش باکتریهای احیا کننده سولفات

به روش MPN - روش آزمون

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد شناسائی و شمارش باکتریهای احیا کننده سولفات در آب میباشد .

۲ دامنه کاربرد

این روش آزمون برای شناسائی و شمارش باکتریهای احیا کننده سولفات در آب و رسوبات تشکیل شده در آب به روش بیشترین تعداد احتمالی به کار میرود .

۳ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد به آنها ارجاع داده شده است. بدین‌ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد محسوب می‌شود. در مورد مراجع دارای تاریخ چاپ و / یا تجدید نظر، اصلاحیه‌ها و تجدید نظرهای بعدی این مدارک مورد نظر نیست. معهذا بهتر است‌کاربران ذینفع این استاندارد، امکان کاربرد آخرین اصلاحیه‌ها و تجدید نظرهای مدارک الزامی زیر را مورد بررسی قرار دهند. در مورد مراجع بدون تاریخ چاپ و / یا تجدید نظر، آخرین چاپ و / یا تجدید نظر آن مدارک الزامی ارجاع داده شده مورد نظر است .

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است :

۳ـ۱ استاندارد ملی ایران ٤٢٠٨ : سال ۱۳۷۵ آئین کار نمونه برداری از آب جهت آزمونهای باکتریولوژیکی .

۳ـ۲ استاندارد ملی ایران ٢٧٤٧ سال ۱۳۸۰ : تجدید نظر اول میکروبیولوژی - آئین کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی .

۳ـ۳ استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ سال ۱۳۸۰ : آئین کاربرد روشهای عمومی آزمایشهای میکروبیولوژی.

۴ اصطلاح و تعریف

در این استاندارد اصطلاح و / یا واژه با تعریف زیر بکار می رود :

باکتریهای احیا کننده سولفات :

به باکتریهایی گفته می شود که در محیط های ذکر شده در این استاندارد در دمای ۳۷–۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۲۱ روز ایجاد رسوب سیاه رنگ می نماید و یا اینکه با افزودن ۰/۵ میلی لیتر معرف کلریدفریک و ۰/۵ میلی لیتر معرف پارا آمینو دی متیلن آنیلین طی مدت ۱۵ دقیقه ایجاد رنگ آبی می نماید .

۵ نمونه برداری

نمونه برداری باید مطابق با استاندارد ملی ایران ٤٢٠٨ سال ١٣٧٥ :آئین کار نمونه برداری از آب جهت آزمونهای باکتریولوژیکی انجام شود.

۶ اساس روش

نمونه های آب و رسوبات آبی و رقت هایی از این نمونه ها با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی در لوله های حاوی محیط کشت ریخته به صورت آزمون ۵ لوله ای شمارش می شوند. این آزمون در شرایط بی هوازی در دمای ۳۷–۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۲۱ روز قرار داده می شود. تشکیل رسوب سیاه رنگ نشان دهندهٔ واکنش مثبت می باشد .

۷ مواد لازم

به منظور بدست آوردن نتایج یکنواخت لازم است از مواد اولیه ای با کیفیت و درجه خلوص یکسان استفاده نمود . آب مورد مصرف نیز باید از نوع تقطیر شده با تجهیزات شیشه ای بوده و عاری از مواد بازدارنده رشد میکروارگانیزمها باشد . در صورتیکه آب کلرینه شده جهت تهیه آب مقطر استفاده شود باید قبل از تقطیر کلر آن خنثی گردد .

بهتر است حتی المقدور محیط های کشت تازه تهیه شود.

۷-۱ محیط کشت استارکی الف : [۲]

ترکیبات	مقدار برای غلظت معمولی	مقدار برای غلظت مضاعف
سدیم لاکتات	۳/۵ گرم	۷ گرم
آمونیم کلراید	۱ گرم	۲ گرم
دی پتاسیم هیدروژن ارتوفسفات	۰/۵ گرم	۱ گرم

1- *MPN: Most Probable Number*
2- *Starkey, s Medium A*
3- *Sodium Lactate($C_3H_5NaO_3$)*
4- *Ammonium Chloride(NH_4Cl)*

منیزیم سولفات	۲ گرم	٤ گرم
سدیم سولفات	۰/۵ گرم	۱ گرم
ترکیبات	**مقدار برای غلظت معمولی**	**مقدار برای غلظت مضاعف**
کلسیم کلراید	۰/۱ گرم	۰/۲ گرم
تیوگلیکولیک اسید	۰/۱ گرم	۰/۲ گرم
آمونیم فروسولفات	۰/۰۰۱ گرم	۰/۰۰۲ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

برای تهیه محیط کشت معمولی و مضاعف ترکیبات فوق را در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته و حرارت داده تا حل شوند. سپس در پنج لوله با قطر مضاعف هر یک ۱۰ میلی لیتر محیط کشت مضاعف و در ۱۰ لوله با قطر معمولی هر یک ۱۰ میلی لیتر محیط کشت معمولی ریخته و به مدت ۱۵دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس سترون نمائید. pH محیط باید بعد از سترون نمودن ۰/۱± ۷/۲ باشد .

۷-۲ محیط کشت استارکی ب :

ترکیبات این محیط مانند ترکیبات محیط کشت الف می باشد . با این تفاوت که آب مورد استفاده برای تهیه محیط کشت در واقع همان آبی است که به عنوان نمونه از محل نمونه برداری تهیه شده سپس آنرا از صافی هائی با منافذیی به قطر ۱/۲ میکرومتر عبور داده تا ذرات معلق آن جدا شود .

پس از تهیهٔ محیط کشت استارکی(ب) منطبق با روشهای مذکور و قبل از توزیع آن در صورت نیاز pH محیط را تنظیم کنید سپس محیط را با عبور از صافی غشائی با منافذی به قطر ۰/۲ میکرومتر سترون نمائید و در شرایط سترون در لوله های سترون توزیع کنید .

5- Dipotassium, hydrogen orthophosphate(K_2HPO_4)
6- Magnesium sulfate($MgSO_4.7H_2O$)
7-Sodium Sulfate(Na_2SO_4)
1- Calcium Chloride($CaCl_2$. $2H_2O$)
2- Thioglycollic acid
3- Ammonium ferrous sulfate or ferrous ammonium sulfate($(NH_4)_2SO_4$. $FeSO_4$. $6H_2O$)
4- Water (H_2O)
5- Double Strength
6- Single Strength

۷-۳ محیط Post gate B

ترکیبات	مقدار برای غلظت معمولی	مقدار برای غلظت مضاعف
پتاسیم دی هیدروژن فسفات	۰/۵ گرم	۱گرم
کلرید آمونیوم	۱ گرم	۲ گرم
سولفات کلسیم	۱ گرم	۲ گرم
سولفات منیزیم	۲ گرم	٤ گرم
لاکتات سدیم	۳/۵ گرم	۷ گرم
عصاره مخمر	۱ گرم	۲ گرم
اسید آسکوربیک	۰/۱ گرم	۰/۲ گرم
اسید تیوگلیکولیک	۰/۱ گرم	۰/۲ گرم
سولفات آهن	۰/۵ گرم	۱ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

برای تهیه محیط کشت معمولی و مضاعف ترکیبات فوق را در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته و حرارت داده تا حل شوند . سپس در پنج لوله با قطر مضاعف هر یک ۱۰ میلی لیتر محیط کشت مضاعف و در ۱۰ لوله با قطر معمولی هر یک ۱۰ میلی لیتر محیط کشت معمولی ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در اتو کلاو سترون نمائید . pH محیط باید بعد از سترون نمودن ۰/۱ ± ۷/۲ باشد .

۷-۴ محیط VMI

ترکیبات	مقدار
پتاسیم دی هیدروژن فسفات	۰/۵ گرم
کلرید آمونیوم	۱ گرم
سولفات سدیم	٤/۵ گرم
لاکتات سدیم	۱۰ گرم
سیترات سدیم	۰/۳ گرم
ترکیبات	**مقدار**
کلرید منیزیم	۹ گرم

کلرید کلسیم با دو مولکول آب	۰/۰٤ گرم
سولفات منیزیم با ۷ مولکول آب	۰/۰٦ گرم
سولفات آهن با ۷ مولکول آب	۰/۵ گرم
اسید کازامینو	۲ گرم
تریپتون	۲ گرم
اسید آسکوربیک	۰/۱ گرم
تیوگلیکولیک اسید	۰/۱ گرم
آگار	۲۰ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

مقادیر فوق را در یک لیتر آب مقطر حل نموده ، حرارت دهید تا آگار آن حل شود، محیط کشت را در لوله ها تقسیم نموده و در حرارت ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۰-۵ دقیقه اتوکلاو کنید pH محیط باید بعد از سترون نمودن ۰/۱ ± ۷/۲ باشد. سپس لوله ها را در سطح مورب قرار داده و آگار مورب تهیه کنید .[1]

۷-۵ معرف تست هیدروژن سولفید

۷-۵-۱ محلول ذخیرهٔ فریک کلرید[2]

ترکیبات	مقدار
فریک کلرید	۱۳/۵گرم
اسیدکلریدریک غلیظ	۲۵۰ میلی لیتر
آب مقطر	۲۵۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

فریک کلرید را در آب و اسید کلریدریک حل نمائید . محلول باید در یک ظرف تیره رنگ و در بسته نگهداری شود و هر ماه بطور تازه تهیه شود .

1- Slant Agar
2- $FeCl_3 . 6H_2O$

۷-۵-۲ محلول ذخیره پاراآمینو دی متیل آنیلین دی هیدروکلراید [1]

ترکیبات	مقدار
آمینو دی متیل آنیلین دی هیدروکلراید	۱ گرم
اسید کلریدریک شش نرمال	۵۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

پارا آمینو دی متیل آنیلین دی هیدروکلراید را در اسید کلریدریک شش نرمال حل نمائید این محلول را می توان برای مدت یک ماه در ظروف تیره رنگ و در بسته نگهداری نمود .

۷-۶ پارافین مایع یا روغن معدنی سترون

۷-۷ بافر رقیق کننده (محلول ذخیره)

۷-۷-۱ محلول فسفات ذخیره

ترکیبات	مقدار
دی هیدروپتاسیم فسفات	۳٤ گرم
آب	۵۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

دی هیدروپتاسیم فسفات را در آب حل کرده سپس[2] توسط هیدروکسید سدیم ۱ نرمال ، pH را روی ۷/۳[3] تنظیم نمائید و با آب مقطر به حجم یک لیتر برسانید .

۷-۷-۲ محلول منیزیم کلرید [4]

ترکیبات	مقدار
منگنز کلرید	۳۸ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

1- $C_8H_{12}N_2.\ 2HCl$
2- KH_2PO_4
3- $NaOH$
1- $mgcl_2$

طرز تهیه : منگنز کلرید را در یک لیتر آب مقطر حل نمائید .

۷-۸ بافر رقیق کننده (محلول کار)

طرز تهیه : ۱/۲۵ میلی لیتر از آب رقیق کنندهٔ بافر(ذخیره) و ۵ میلی لیتر از محلول منیزیم کلرید را به ۵۰۰ میلی لیتر آب اضافه نمائید و حجم آنرا به یک لیتر برسانید . محلول فوق را خوب بهم بزنید و ۹۰ میلی لیتر از آنرا در بطری های در پیچ دار تقسیم نمائید و در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون نمائید .

۸ وسایل لازم

وسایل معمول برای آزمایشهای میکروبیولوژی،برای کسب آگاهی های بیشتر به استاندارد ملی ایران ـ ۲۷٤۷ سال ۱۳۸۰ مراجعه شود.

۹ روش آزمون

لوله های حاوی محیط کشت و محلولهای رقیق کننده را در حمام آب گرم ٦۰ درجه سلسیوس حرارت داده و سریعاً آنها را تا دمای ۲۰ درجه سلسیوس خنک کنید تا اکسیژن محلول از محیط خارج شود .

نمونه را کاملاً هم بزنید (حداقل ۲۵ بار) و ۱۰ میلی لیتر از نمونه را به ۹۰ میلی لیتر محلول رقیق کننده اضافه نمائید.

به هر کدام از پنج لولهٔ حاوی محیط مضاعف طبق بندهای ۷-۱ یا ۷-۲ و یا ۷-۳، ۱۰ میلی لیتر نمونه بیفزائید به ۵ لوله سری اول که حاوی محیط کشت با غلظت معمولی طبق بندهای ۷-۱ یا ۷-۲ و یا ۷-۳، است ۱ میلی لیتر از نمونه اضافه کنید به ۵ لوله سری دوم که حاوی محیط کشت با غلظت معمولی طبق بندهای ۷-۱ یا ۷-۲ و یا ۷-۳، است ۱ میلی لیتر از رقت ۰/۱ نمونه اضافه کنید .

۲ تا ۳ میلی لیتر پارافین مایع سترون را به هر لوله اضافه نمائید تا شرایط بی هوازی برای میکروبها ایجاد شود .

بهتر است لوله ها در جار بی هوازی و در دمای ۳۷–۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۲۱ روز گرمخانه گذاری شود.

یادآوری : برای جدا سازی و شمارش باکتریهای گرماپای احیا کنندهٔ سولفات از آبهای آلوده به مواد روغنی و گاز همهٔ محیط های کشت ، محلولهای رقیق کننده و هر آنچه گرمخانه گذاری می شود باید در دمای حداقل ٤٥ درجهٔ سلسیوس نگهداری شود. نمونه باید ترجیحاً در دمای محیط نگهداری شود.

لازم است همراه با هر سری ۵ تایی از یک لوله محیط کشت که به آن به جای نمونه ، ۱۰ میلی لیتر یا ۱ میلی لیتر آب مقطر سترون اضافه شده ، به عنوان کنترل منفی استفاده شود .

تشکیل رسوبات سیاهرنگ (سولفیت) نشانهٔ واکنش مثبت می باشد .

به لوله هایی که در آنها رسوب سیاهرنگ تشکیل نشده است، ۰/۵ میلی لیتر از معرف کلریدفریک و ۰/۵ میلی لیتر از معرف پارا آمینو دی متیل آنیلین اضافه نمائید . این معرفها را بوسیلهٔ سرنگ یا پیپت پاستور بلند به ته لوله ها بریزید . پیدایش رنگ آبی در مدت ۱۰ دقیقه نشانهٔ واکنش مثبت و وجود هیدروژن سولفید (H_2S) است .

۱۰ آزمون های تاییدی

۱۰–۱ برای انجام آزمون تاییدی از لوله های مثبت در روش MPN، ۰/۱ میلی لیتر برداشت نموده و در محیط VMI (طبق بند ۷–٤) کشت دهید (هم در عمق و هم در سطح محیط) نمونه ها را در دمای ۳۵–۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۱۰–۷ روز در شرایط بی هوازی قرار دهید . ایجاد کلنی های سیاه رنگ در عمق محیط نشانه وجود باکتریهای احیا کننده سولفات می باشد.

1- Thermophill

۱۱ روش محاسبه

در هر سری از لوله های پنج تایی لوله هایی را که واکنش مثبت داده اند و در آزمون تاییدی، مورد تایید قرار گرفته اند شمارش کرده و تعداد احتمالی باکتریهای احیا کننده سولفات را با استفاده از جدول MPN پنج لوله ای که در پیوست الف نوشته شده است محاسبه کنید .(به استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ سال ۱۳۸۰ رجوع شود.)

	۰/۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	۱۰میلی لیتر
مثال۱: ۲۲۰ باکتری احیا کننده سولفات در ۱۰۰ میلی لیتر	۲/۵	۴/۵	۵/۵
مثال۲: ۱٤۰ باکتری احیا کننده سولفات در ۱۰۰ میلی لیتر	۲/۵	۳/۵	۵/۵
مثال۳: ۲۳ باکتری احیا کننده سولفات در ۱۰۰ میلی لیتر	۰/۵	۰/۵	۵/۵

یادآوری : *در صورتیکه نتیجه آزمون طبق جدول ۱ به صورت ۵-۵-۵ باشد ابتدا باید از نمونه رقت تهیه نموده و آزمون با استفاده از رقت تهیه شده مجددا تکرار گردد.*

۱۲ گزارش آزمون

نتایج آزمون را به صورت تعداد باکتریهای احیا کننده سولفات در ۱۰۰ میلی لیتر نمونه طبق جدول الف ـ ۱ پیوست الف گزارش کنید .

پیوست الف
(الزامی)

جدول الف ـ ۱ : تخمین محتمل ترین تعداد باکتری در ۱۰۰ میلی لیتر نمونه به روش ۵ لوله ای

تعداد لوله های واکنش مثبت				تعداد لوله های واکنش مثبت			
۵تا ۱میلی لیتر	۵تا ۱۰میلی لیتر	۵تا ۱۰۰میلی لیتر	M.P.N درصد میلی لیتر	۵تا ۱میلی لیتر	۵تا ۱۰میلی لیتر	۵تا ۱۰۰میلی لیتر	M.P.N درصد میلی لیتر
۰	۰	۰	کمتر از ۲	٤	۳	۰	۲۷
۰	۱	۰	۲	٤	۳	۱	۳۳
۰	۲	۰	٤	٤	٤	۰	۳٤

۲۳	۰	۰	۵	۲	۰	۰	۱
۳۱	۱	۰	۵	٤	۱	۰	۱
٤۳	۲	۰	۵	٤	۰	۱	۱
۳۳	۰	۱	۵	٦	۱	۱	۱
٤٦	۱	۱	۵	۵	۰	۰	۲
٦۳	۲	۱	۵	۷	۱	۰	۲
٤۹	۰	۲	۵	۷	۰	۱	۲
۷۰	۱	۲	۵	۹	۱	۱	۲
۹٤	۲	۲	۵	۹	۰	۲	۲
۷۹	۰	۳	۵	۱۲	۰	۳	۲
۱۱۰	۱	۳	۵	۸	۰	۰	۳
۱٤۰	۲	۳	۵	۱۱	۱	۰	۳
۱۸۰	۳	۳	۵	۱۱	۰	۱	۳
۱۳۰	۰	٤	۵	۱٤	۱	۱	۳
۱۷۰	۱	٤	۵	۱٤	۰	۲	۳
۲۲۰	۲	٤	۵	۱۷	۱	۲	۳
۲۸۰	۳	٤	۵	۱۷	۰	۳	۳
۳۵۰	٤	٤	۵	۱۳	۰	۰	٤
۲٤۰	۰	۵	۵	۱۷	۱	۰	٤
۳۵۰	۱	۵	۵	۱۷	۰	۱	٤
۵٤۰	۲	۵	۵	۲۱	۱	۱	٤
۹۲۰	۳	۵	۵	۲٦	۲	۱	٤
۱٦۰۰	٤	۵	۵	۲۲	۰	۲	٤
بیش از ۱۸۰۰	۵	۵	۵	۲٦	۱	۲	٤

ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

_5870

Water - Detection and enumeration

Sulfate reducing bacteria - MPN ۱ -

Method - Microbiological test method

–

1st. Revision